云 南 植 物 研 究 2002，24（2）：215～221
Acta Botanica Yunnanica

不同花色矮牵牛细胞色素 b5 蛋白的 cDNA 克隆及序列分析*

刘继梅，鄢 波，郑丽屏，杜云龙，王玲仙，黄兴奇**
（云南省农业科学院生物技术研究所，云南 昆明 650223）

摘要：以云南不同花色矮牵牛的花瓣为材料，提取总 RNA，用 Oligo（dT）作为引物反转录合成 cDNA 第一链。以此为模板，用根据国外报道的矮牵牛细胞色素 b5 蛋白的 cDNA 序列设计合成的引物进行 PCR 扩，均扩增到一条约 450bp 的片段，分别克隆到 pGEM－T 载体上。对重组克隆进行序列分析，结果表明所克隆到的矮牵牛细胞色素 b5 蛋白的 cDNA 的编码区均含有 447 个核苷酸，编码 149 个氨基酸残基，与国外报道的一致；但其核苷酸及氨基酸的序列与国外报道的有所不同，即与国外的相比，紫红色、蓝紫色矮牵牛中的该 cDNA 的核苷酸有 1 个不同，而氨基酸完全相同；粉红色、白色矮牵牛中的有 3 个核苷酸不同，并导致了 2 个氨基酸的不同。暗示该基因对花色的调控可能与其编码 cDNA 的一级结构有关。

关键词：花色；矮牵牛；细胞色素 b5 蛋白（Cyt b5）；基因克隆
中图分类号：Q 75，Q 945　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0253－2700（2002）02－0215－07

cDNA Cloning and Sequencing of Cytochrome b5 Protein from *Petunia hybrida* Strains with Different Flower Colors

LIU Ji-Mei，YAN Bo，ZHENG Li-Ping，DU Yun-Long，WANG Ling-Xian，HUANG Xing-Qi**
（*Institute of Biotechnology*，*Yunnan Academy of Agricultural Sciences*，Kunming 650223）

Abstract：Total RNAs were extracted from the petals of *Petunia hybrida* strains with different flower colors. Using Olig（dT）as pimer，the total RNAs were synthesized into the first strand of cDNA by reverse transcription reaction. By Polymerase Chain Reaction（PCR）amplification，we obtained a cDNA fragment in length of about 450bp from different *Petunia* strains. The primes used for PCR amplification were designed according to the cDNA encoding region of cytochrome b5 protein that were reported previously. The PCR products were cloned into pGEM-T vector，respectively. We analyzed the sequences of different recombinant plasmids and compared them with the reported cDNA sequence of Cyt b5. We found that their encoding areas all contain 447 nucleotides and encode 149 amino acid residues. However，the cDNAs from violet and blue *Petunia* have one different nucleotide，but without different amino acid residues from the reported cDNA；those from pink and white *Petunia* have three different nucleotides and two different amino acid residues from the reported cDNA. These results imply that the Cyt b5 gene regulation on flower

* 基金项目：云南省省院－省校合作项目资助
** 通信联系人
收稿日期：2001－06－28，2001－10－08 接受发表
作者简介：刘继梅（1973－）女，云南人，助研，主要从事植物生理及分子生物学方面的研究。

color may be relevant to the primary structure of its encoding cDNA.

Key words: Flower color; *Petunia hybrida*; Cytochrome b5 protein (Cyt b5); cDNA cloning

随着经济的快速发展，人们对花卉的需求也日益增加，尤其是具有优良品质特性的高档奇花异卉更具有广阔的市场前景。花色就是其中的一个重要品质特性，花的颜色是一种复杂性状，主要由三大类色素决定，即类黄酮（flavonoids）、类胡萝卜素（carotenoids）及甜菜色素（betalains），而产生花色最常见的色素是类黄酮类的花色素苷。它的合成途径目前已研究得较为深入，其中的许多关键酶基因已从不同物种中克隆到，如欧芹（Kreuzaler 等，1983）、矮牵牛（Reif 等，1985）的 CHS 基因；金鱼草（Martin 等，1991）、康乃馨（Britsch 等，1993）的 F3H 基因；金鱼草（Martin 等，1991）、玉米（Fedorff 等，1984）的 3GT 基因等。此外还克隆到许多调节基因，如玉米中的 Sn 基因（Tonelli 等，1991）；金鱼草中的 DEF 基因（Samach 等，1997）；百日草中的 TED3 基因（Igarashi 等，1998）等。我们感兴趣的是类黄酮 3′，5′－羟基化酶（F3′5′H），它是控制蓝色花色素苷合成的关键酶之一，催化二氢堪非醇和二氢栎皮黄酮羟基化成二氢杨梅黄酮，后者再经催化就生成蓝色的花色素——翠雀素。自然界中的许多花如康乃馨、玫瑰等，都缺乏蓝色，主要是因为它们中的 F3′5′H 活性较低或没有活性。最近有研究（Vetten 等，1999）证明，细胞色素 b5（Cyt b5）蛋白是调控 F3′5′H 活性的关键因子之一，因此本研究的目的之一就是克隆编码该蛋白的基因，为通过基因工程培育蓝色花卉提供新的目的基因；目的之二是分析不同花色矮牵牛中编码该蛋白的 cDNA 序列，为从分子生物学的角度来阐明该基因对花色的调控机制提供线索。

1 材料和方法

1.1 材料

白色、粉红色、紫红色、蓝紫色矮牵牛（*Petunia hybrida* L.）均采自世博园花卉培育基地。转化受体菌为大肠杆菌 DH5a，由本实验室保存；克隆载体为 pGEM－T 载体系统，购自 Promega 公司；cDNA 合成试剂盒购自 GIBCOBRL 公司；dNTP、限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶及反应缓冲液购自华美生物工程公司；其他化学常规试剂购自宝生物有限公司。

1.2 方法

取 100 mg 矮牵牛花瓣于研钵中，加液氮研磨成粉末状，参照分子克隆实验指南（萨姆布鲁克等，1992）中的异硫氰酸胍法提取总 RNA，存于－70℃备用。

按照 GIBCOBRL 公司 cDNA 合成试剂盒的说明书进行，以矮牵牛 RNA 为模板，Oligo（dT）为引物，在 MulV 反转录酶的作用下，合成 cDNA 的第一链，于－20℃保存。

参考国外发表的细胞色素 b5 蛋白基因序列（Vetten 等，1999），设计一对特异 PCR 引物，上游引物为 5′AGATCTAAATGGACAAACAAAGAGTG 3′，下游引物为 5′GAATTCTCAAAACTGGAGAGCTCCAG 3′，由美国 CyberSyn 公司合成；以反转录合成的 cDNA 第一链为模板，进行 PCR 扩增。反应条件为：94℃变性 1 min，60℃退火 1 min，72℃延伸 1 min，共 35 个循环，最后 72℃再延伸 7 min。扩增反应在 Peltier Thermal Cycle 200 型扩增仪上进行。

PCR 的扩增产物经琼脂糖胶回收纯化后，在 T_4DNA 连接酶的作用下与 pGEM-T 载体进行连接，连接产物转化大肠杆菌 DH5a 感受态细胞。在 X-gal/IPTG 培养基上挑取白色菌落，用 PCR 扩增法初步筛选阳性重组克隆。从初筛出的克隆中提取重组质粒，用合适的限制性内切酶进行鉴定。将鉴定出的重组质粒在 ABI PRISM™377 DNA 测序仪上进行序列测定。

2　实验结果

2.1　Cyt b5 基因的扩增、克隆及鉴定

分别以不同花色矮牵牛花瓣中提取的 RNA 为模板，Oligo（dT）为引物合成 cDNA 第一链，再以此为模板，用特异引物进行 PCR 扩增，产物经 2%琼脂糖凝胶电泳检测，均显示出一条约 450bp 的特异扩增带（图 1），与预期目的片段的大小一致；分别将这些片段纯化后，克隆到 pGEM-T 载体上，通过 PCR 法初筛及限制性内切酶酶切鉴定，发现重组质粒中均含有 450bp 的片段（图 2），分别将含有从白色花瓣、粉红色花瓣、紫红色花瓣、蓝紫色花瓣中扩增得到的目的片段的重组质粒，命名为 pL-WDIF、pL-PDIF、pL-RDIF、p-BDIF。

2.2　序列测定及分析

分别对重组质粒 pL-WDIF、pL-PDIF、pL-RDIF 、p-BDIF 进行序列测定，测定结果（图 3）表明从不同花色矮牵牛花瓣中扩增到的 cDNA 片段，均是编码 Cyt b5 蛋白的 cDNA，全长为 452 个核苷酸，编码区为 447 个核苷酸，编码 149 个氨基酸残基，但从紫红色、蓝紫色花瓣中克隆到的该 cDNA，其核苷酸及氨基酸序列与粉红色、白色中的有所不同；前二者的 cDNA 与国外报道的该 cDNA（Vetten 等，1999）相比，它们的氨基酸序列完全一致，但是核苷酸序列稍有不同，即前二者的第 158 号核苷酸是 T 而国外报道的是 A；后二者与国外报道的相比，其核苷酸及氨基酸序列的差异稍大一点，即有三个核苷酸不同，且导致了两个氨基酸的不同（图 3）。

3　讨论

目前，花卉花色基因工程育种已成为国际上的研究热点，该研究具有强大的发展潜力，是花卉育种的新领域、新技术、新方向，一旦有突破并成功的应用于实践，其效益是不可低估的。迄今，通过基因工程成功地进行花色修饰的报道还很少，只见矮牵牛（Davies 等，1998）、非洲菊（Elomaa 等，1996）、高原龙胆（Ledger 等，1997）等少数花卉品种上有报道，且未见一例是成功的修饰成蓝色花色的。而自然界中许多具有观赏价值的花卉都缺乏蓝色，如玫瑰、康乃馨、郁金香等，因此，花卉蓝色花色的基因工程育种的意义就更为重大。

随着对花色形成机制的深入研究，科研工作者们发现许多花卉缺乏蓝色，主要是因为它们中控制蓝色花色素苷合成的关键酶——类黄酮 3′，5′羟基化酶（F3′5′H）缺乏活性或活性较低。要解决这一问题，就必须找到影响 F3′5′H 活性的因子。经过多年的努力，国外的研究者们（Vetten 等，1999）发现细胞色素 b5（Cyt b5）蛋白是影响 F3′5′H 活性的主要因子之一，即通过转座子的插入使编码 Cyt b5 蛋白的基因被突变失活后，F3′5′H 的活性就大幅度的下降，并导致了花色的改变。但是，Cyt b5 蛋白对 F3′5′H 活性的调节机制还不清楚。

我们知道 Cyt b5 蛋白普遍存在于动物、植物、酵母中，自然它在不同花色的花卉中也都应该存在，这就可以排除一些花卉中 F3′5′H 活性较低的原因，是因为缺乏 Cyt b5 蛋白，我们推测可能是不同花色中编码 Cyt b5 蛋白的基因结构不同。为证实这一推测，我们以不同花色的矮牵牛为材料，分别克隆其编码 Cyt b5 蛋白的 cDNA。通过与国外报道的 cDNA 进行比较，结果（图 3）证明我们克隆到的 cDNA 正是编码 Cyt b5 蛋白的 cDNA，都含有

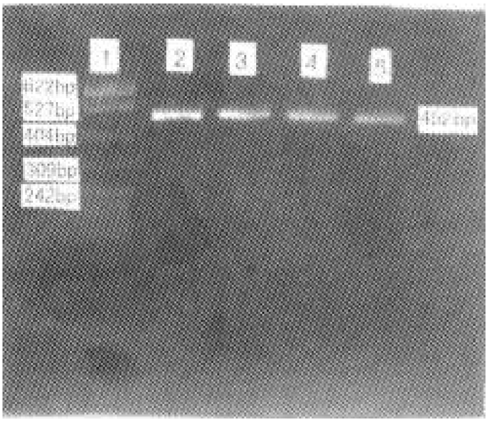


图 1　Cyt b5 基因的 PCR 扩增

1．pBR322 DNA/Msp I 标准分子；2，3，4，5 分别是白色、粉红色、紫红色、蓝紫色矮牵牛 Cyt b5 基因的 PCR 扩增；

Fig．1　PCR amplification of Cyt b5 gene

1．pBR322 DNA/Msp I marker；2，3，4，5 PCR amplification of Cyt b5 gene from white，pink，violet，blue *Petunia*，respectively．

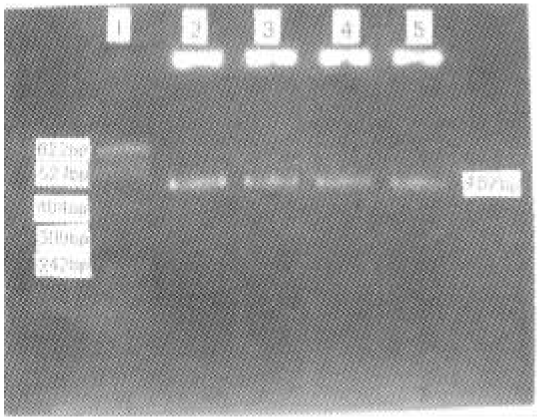


图 2　重组质粒的酶切鉴定

1．pBR322 DNA/Msp I 标准分子；2，3，4，5 分别是 pL-WDIF、pL-PDIF、pL-RDIF、pL-BDIF 重组质粒的 BglII + EcoRI 酶切结果；

Fig．2　Identification of recombinant plasmids

1．pBR322 DNA/Msp I marker，2，3，4，5 digested results of pL-WDIF，pL-PDIF，pL-RDIF，pL-BDIF recombinantplasmids with BglII + EcoRI，respectively．

452 个核苷酸，编码 149 个氨基酸残基，且从不同花色花瓣中克隆到的这些 cDNA 是有差异的，即紫红色、蓝紫色矮牵牛中 Cyt b5 cDNA 的核苷酸及氨基酸序列与粉红色、白色矮牵牛的有所不同，前二者的第 253 号、255 号核苷酸分别是 C、T，而后二者的是 G、C，且这两个核苷酸的不同导致了氨基酸的不同，即前二者的第 84 号、85 号氨基酸分别是丙氨酸（Ala）、丝氨酸（Ser），而后二者的是甘氨酸（Gly）、脯氨酸（Pro）。氨基酸的改变很容易导致其编码蛋白的活性或对底物的选择性的改变，在花色调控机制的研究中就有一个较为典型的例子（Johnson 等，2001），即自然界中的矮牵牛缺乏橙色，原因是它们中的二氢黄酮醇 - 4 - 还原酶（DFR）不能以二氢堪非醇（DHK）为底物，而 DHK 是橙色色素合成途径中的一个关键的中间产物，通过研究发现当矮牵牛 DFR 的编码氨基酸序列中的天冬酰氨（Asn）被突变为亮氨酸（Leu）时，则其 DFR 就能以 DHK 为底物，并通过转入突变的 DFR 基因得到了橙色的矮牵牛。因此，我们认为 Cyt b5 蛋白编码 cDNA 的氨基酸序列在紫色色调与其他色调矮牵牛之间的差异，可能就是其影响 F3′5′H 活性的原因，也就是说 Cyt b5 基因对花色的调控可能与其编码 cDNA 的线形结构有关，进一步的研究正在进行中。

综上所述，我们不仅从不同花色的矮牵牛中克隆到了 Cyt b5 基因，为通过基因工程培育蓝色花卉提供了新的目的基因；而且，对不同花色的矮牵牛中 Cyt b5 蛋白的编码 cDNA 序列进行了比较分析，得出了相应的推断，为进一步探讨 Cyt b5 基因对花色的调控机制提供了线索。目前，我们已将蓝色和白色矮牵牛的 Cyt b5 蛋白的编码 cDNA 构建到了真核表达载体中，准备通过转基因手段来进行深入的研究。

```
A 1AA ATG GAC AAA CAA AGA GTG TTT ACA CTT TCT CAA GTC GCA GAA CAC AAG TCA AAG   56
B 1++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++   56
C 1++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++   56
D 1++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++   56
E 1++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++   56
a 1    M   D   K   Q   R   V   F   T   L   S   Q   V   A   E   H   K   S   K    18
b 1    +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +    18
c 1    +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +    18
d 1    +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +    18
e 1    +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +    18
  57  CAA GAT TGC TGG ATT ATC ATC AAT GGC AGA GTA GTA GAT GTA ACA AAG TTC TTG   110
  57  +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++   110
  57  +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++   110
  57  +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++   110
  57  +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++   110
  19   Q   D   C   W   I   I   I   N   G   R   V   V   D   V   T   K   F   L    36
  19   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +    36
  19   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +    36
  19   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +    36
  19   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +    36
 111 GAA CAA CAT CCT GGA GGA GAA GAA GTG TTG ATT GAA TCA GCA GGA AAG GAT GCA    164
 111 +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ ++T +++ +++ +++ +++    164
 111 +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ ++T +++ +++ +++ +++    164
 111 +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ ++T +++ +++ +++ +++    164
 111 +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ ++T +++ +++ +++ +++    164
  37   E   F   H   P   G   G   E   E   V   L   I   E   S   A   G   K   D   A    54
  37   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +    54
  37   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +    54
  37   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +    54
  37   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +    54
 165 ACT AAA GAG TTT CAA GAT ATT GGA CAT AGT AAA GCT GCC AAG AAC TTG CTT TTC    218
 165 +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++    218
 165 +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++    218
 165 +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++    218
 165 +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++    218
  55   T   K   E   F   Q   D   I   G   H   S   K   A   A   K   N   L   L   F    72
  55   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +    72
  55   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +    72
  55   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +    72
  55   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +    72
 219 AAA TAC CAA ATT GGA TAT CTT CAA GGT TAC AAA GCC TCA GAT GAT TCT GAA CTT    272
 219 +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++    272
 219 +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++    272
 219 +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +G+ C++ +++ +++ +++ +++ +++    272
 219 +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +G+ C++ +++ +++ +++ +++ +++    272
  73   K   Y   Q   I   G   Y   L   Q   G   Y   K   A   S   D   D   S   E   L    90
  73   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +    90
  73   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +    90
  73   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   G   P   +   +   +   +   +    90
  73   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   +   G   P   +   +   +   +   +    90
 273 GAA CTC AAC TTA GTC ACT GAT TCC ATC AAA GAA CCA AAT AAG GCC AAA GAA ATG    326
 273 +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++    326
 273 +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++    326
 273 +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++    326
 273 +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++ +++    326
```

91	E	L	N	L	V	T	D	S	I	K	E	P	N	K	A	K	E	M	108
91	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	108
91	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	108
91	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	108
91	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	108
327	AAG	GCT	TAT	GTT	ATC	AAA	GAA	GAT	CCT	AAG	CCA	AAG	TAT	CTG	ACT	ATT	GTT	GAG	380
327	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	380
327	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	380
327	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	380
327	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	380
109	K	A	Y	V	I	K	E	D	P	K	P	K	Y	L	T	I	V	E	126
109	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	126
109	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	126
109	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	126
109	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	126
381	TAC	TTA	TTG	CCC	TTC	TTG	GCT	GCT	GCC	TTC	TAC	CTC	TAT	TAT	CGC	TAT	CTA	ACT	434
381	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	434
381	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	434
381	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	434
381	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	434
127	Y	L	L	P	F	L	A	A	A	F	Y	L	Y	Y	R	Y	L	T	144
127	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	144
127	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	144
127	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	144
127	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	144

435	GGA	GCT	CTC	CAG	TTT	TGA	452
435	+++	+++	+++	+++	+++	+++	452
435	+++	+++	+++	+++	+++	+++	452
435	+++	+++	+++	+++	+++	+++	452
435	+++	+++	+++	+++	+++	+++	452
145	G	A	L	Q	F	*	149
145	+	+	+	+	+	*	149
145	+	+	+	+	+	*	149
145	+	+	+	+	+	*	149
145	+	+	+	+	+	*	149

图3　Cyt b5 cDNA 的核苷酸序列及推导的氨基酸序列

A、B、C、D、E 分别代表国外报道的及紫红色、蓝紫色、粉红色、白色矮牵牛中 Cyt b5 基因的核苷酸序列；a、b、c、d、e 分别代表国外报道的及紫红色、蓝紫色、粉红色、白色矮牵牛中 Cyt b5 基因的氨基酸序列；"＋"代表相同的核苷酸及氨基酸残基；"□"指示的是有差异的核苷酸及氨基酸残基；"＊"指示的是终止密码子。

Fig. 3　Nucleotide and predicted amino－acid sequence of Cyt b5 cDNA

A，B，C，D，E represents nucleotide sequence of Cyt b5 cDNA reported abroad and from violet，blue，pink，white *Petunia*，respectively. a，b，c，d，e represent predicted amino-acid sequence of Cyt b5 cDNA reported abroad and from violet，blue，pink，white *Petunia*，respectively；"＋" represents identical amino-acid residue and nucleotide；"□" indicates different amino-acid residue and nucleotide；"＊" indicates stop codons.

致谢　感谢世博园花卉培育基地的李文庚先生提供矮牵牛。

〔参 考 文 献〕

萨姆布鲁克，费里奇，曼尼阿蒂斯（金冬雁，黎孟枫等译），1992. 分子克隆实验指南第2版［M］. 北京：科学出版社，352—354

Britsch L，Dedio J，Saedler H，*et al*，1993. Molecular characterization of flavonone 3β-hydroxylase. Consensus sequence，comparison with related enzymes and the role of conserved histidine residues [J]. *Eur J Biochem*，**217**：745—754

Davies KM，Bloor SJ，Spiller GB，*et al*，1998. Production of yellow colour in flowers：redirection of flavonoid biosynthesis in *Petunia* [J]. *Plant J*，**13**（2）：259—266

Vetten N，ter Horst J，Koes R，*et al*，1999. A cytochrome b5 is required for activity of flavonoid 3′，5′-hydroxylase ，a cytochrome P450 involved in the formation of blue flower colors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*，**96**：778—783

Elomaa P，Helariutta Y，Kotilainen M，*et al*，1996. Transformation of antisense constructs of chalcone synthase gene superfamily into *Gerbera hybrida*：differential effect on the expression of family members [J]. *Mol Breeding*，**2**（1）：41—50

Fedorff NV，Furtek DB，Neson OE，*et al*，1984. Cloning of the bronze locus in maize by a simple and generalizable procedure using the transposable element activator [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*，**81**：3825—3829

Igarashi M，Demura T，Fukuda H，*et al*，1998. Expression of the *Zinnia* TED3 promoter in developing tracheary elements of transgenic Arabidopsis [J]. *Plant Mol Biol*，**36**（6）：917—927

Johnson ET，Ryu S，Yi H，*et al*，2001. Alteration of a single amino acid changes the substrate specificity of dihydroflavonol 4-reductase [J]. *Plant J*，**25**（3）：325—333

Kreuzaler F，Ragg H，Fautz E，*et al*，1983. Uv-induction of chalcone synthase mRNA in cell suspension cultures of *Petroselinum hotense* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*，**80**：2591—2593

Ledger SE，Deroles SC，Manson DG，*et al*，1997. Transformation of lisianthus（*Eustoma grandiflorum*）[J]. *Plant Cell Reports*，**16**（12）：853—858

Martin C，Carpenter R，Sommer H，*et al*，1991. Control of anthocyanin biosynthesis in flowers of *Antirrhinum majus* [J]. *Plant J*，**1**：37—49

Reif HJ，Niesbach V，Denmling B，*et al*，1985. Cloning and analysis of two genes for chalcone synthase from *Petunia hybrida* [J]. *Mol Gen Genet*，**199**：208—215

Samach A，Kohalmi SE，Motte P，*et al*，1997. Divergence of function and regulation of class B floral organ identity genes [J]. *Plant Cell*，**9**（4）：559—570

Tonelli C，Consonni G，Dolfini SF，*et al*，1991. Genetic and molecular analysis of Sn：a light-inducible，tissue specific regulatory gene in maize [J]. *Mol Gen Genet*，**225**：401—410